

6 Appendix

6.1 Abbreviations

18S and 28S	Ribosomal RNA in Svedberg unit
³² P / ³³ P	Radioactive phosphor isotopes
³⁵ S	Radioactive sulphur isotopes
AFP	Anterior forebrain pathway
ANOVA	Analysis of variance
Arc	Activity-regulated cytoskeleton-associated protein
Area X	Used as proper name
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Base pairs
BSA	Bovine serum albumine
C2H2 type zinc finger	Classical zinc finger domain containing two conserved cysteines and histidines which coordinate a zinc ion
cDNA	Copy DNA, complementary DNA
c-fms promoter	Colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline
c-Fos	Cellular oncogene fos
ChAT	Choline acetyltransferase
CREB	Cyclic-AMP response element-binding protein
CtBP1	C -terminal binding protein 1
DARPP-32	Dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein with molecular weight 32kDa
DLM	Medial nucleus of the dorsolateral thalamus
DM	Dorsomedial motor nucleus of the intercollicular region
DT	Dorsal thalamus
dUTP	2'-Deoxyuridine 5'-Triphosphate
DVD	Developmental verbal dyspraxia
EST	Expressed sequence tags
EtOH	Ethanol
FITC	Fluorescein-isothiocyanate
FM	Frequency modulation
Fox	Forkhead box
FoxP1	Forkhead box transcription factor, subfamily P, member 1
FoxP2	Forkhead box transcription factor, subfamily P, member 2
FoxP4	Forkhead box transcription factor, subfamily P, member 4
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene
GFP	Green fluorescent protein
h	Hour

HEK293-T	Human embryonic kidney cell line 293 transformed with the SV40 large T antigen
HIV	Human immuno-deficiency virus
Hmbs	Hydroxymethylbilane synthase
Hprt	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
Hu	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, <i>Drosophila</i>)-like gene product
HVC	Used as proper name
IGFII	Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)
kb	Kilobase
kDA	Kilo-Dalton
KE-family	Pseudonym for family in which FoxP2 mutations were first described
KO	Knockdout
LANT6	neurotensin-related hexapeptide
LGE	Lateral ganglionic eminence
IMAN	Lateral magnocellular nucleus of the anterior nidopallium
LSD	Least Significant Difference
mGluR2	Metabotropic glutamate receptor 2
min	Minute
miRNA	Micro-RNA
MMSl	Magnocellular nucleus of the medial striatum previously called LPOm
MO	Mesopallial song nucleus
mRNA	Message RNA
MYA	Million years ago
Nif	Nucleus interfascialis
nNOS	Nitric oxide synthase 1 (neuronal)
NPY	Neuropeptide Y
NR2B	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B
nXIIIts	hypoglossal nucleus, pars tracheosyringalis
Oligo	Oligonucleotide
ORF	Open-reading-frame
PB	Phosphate buffer
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
Pf ₆ p	6- phosphofructokinase, platelet type
PG	Pitch goodness
Pgk1	Phosphoglycerate kinase 1
PHD	Post hatch day
polyQ	Poly-glutamine stretch
PSA-NCAM	Polysialylated form of neural cell adhesion molecule 1
PSL	Pallial-subpallial lamina

R553H	Mutation from arginine to histidine at amino acid # 553
RA	Robust nucleus of the archistriatum
RACE	Rapid Amplification of CDNA Ends
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA interference
rpm	Rounds per minute
RT	Room temperature
SAP	Sound Analysis Pro software
SEM	Standard error of the mean
shControl	Short hairpin RNA with non-targeting control sequence
shFoxP2	Short hairpin RNA targeting FoxP2
shGFP	Short hairpin RNA targeting GFP
Shh	Sonic hedgehog (Shh) pathway
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Short interfering RNA
ssDNA	Single stranded DNA
STDEV	Standard deviation
TH	TyrosineHydroxylase
TOPRO3	DNA-binding dye from Molecular Probes (Eugene, USA)
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling
UTR	Untranslated region
VAS	vocal nucleus of the anterior striatum
VSVg	Vesicular stomatitis virus glycoprotein
ZENK	Avian homolog of the mammalian zif268/EGR-1/ NGFI-A/krox24 gene
Zn-finger	Zink-finger domain

6.2 Abstract

The FoxP2 gene, which encodes a forkhead box transcription factor is essential for developing the full articulatory power of human language. Mutations of FoxP2 cause a speech and language disorder which compromises the fluent production of words and affects the correct use and comprehension of grammar. FoxP2 patients have structural and functional abnormalities in the striatum of the basal ganglia, which also expresses high levels of FoxP2. But how FoxP2 affects brain function remains unknown. The first part of my thesis addresses this question in songbirds, since learning to speak bears behavioral and neural parallels to how songbirds learn to sing. In zebra finches, FoxP2 expression increases in Area X, a basal ganglia structure necessary for song acquisition, during the time when song learning occurs. In canaries, FoxP2 expression levels in Area X are similarly associated with vocal plasticity. Using lentivirus-mediated RNAi in zebra finches we shown that FoxP2 knockdown in Area X impairs song learning. This suggests that auditory-guided vocal learning in the basal ganglia requires FoxP2. These findings provide the first example of a functional gene analysis in songbirds, a widely studied neuroethological model system. Finally, the fact that FoxP2 is involved in both birdsong and speech suggests that the molecular substrate from which the uniquely human capacity of language evolved might not be exclusive to the hominid lineage.

Consistent with this, the FoxP2 protein sequence shows a high degree of conservation among vertebrates. However, human FoxP2 contains changes in amino-acid coding and a pattern of nucleotide polymorphisms which suggests that it has been the target of selection during recent human evolution. This indicates that FoxP2 might have been pivotal for the development of human language. Although language is a uniquely human trait, learned vocalizations are also found in a few other species, among them whales, bats, and most prominently in three orders of birds. Thus, in the second part of my thesis I compared the FoxP2 sequence from 11 bird species covering the 3 orders of vocally learning birds as well as 3 orders in which vocal learning did not evolve and the crocodile, the closest non-avian relative. There was no evidence for an association between specific amino acid substitutions and the capacity for vocal learning. In conclusion, FoxP2 was either not directly involved in the evolution of vocal-learning in birds or selection acted on the large non-coding regions of FoxP2, which were not examined in this study.

6.3 Zusammenfassung

Mutationen im FoxP2-Gen führen zu einer Sprech- und Sprachstörung (developmental verbal dyspraxia, DVD), welche vor allem durch gestörte Artikulationsfähigkeit und Probleme mit dem Verständnis und Gebrauch von Grammatik gekennzeichnet ist. Patienten mit DVD zeigen funktionelle und strukturelle Auffälligkeiten im Striatum der Basalganglien. Im Striatum ist FoxP2 auch stark exprimiert, aber wie genau sich die FoxP2 Mutationen auf die Sprachfähigkeit auswirken ist unbekannt. Im ersten Teil meiner Dissertation näherte ich mich dieser Fragestellung durch Experimente in Singvögeln, da zwischen Sprachlernen und Gesangslernen viele neurobiologische und ethologische Parallelen bestehen. Das Expressionsmuster von FoxP2 in Gehirn der Singvögel stimmt mit den bereits beschriebenen Mustern aus der Maus und dem Mensch überein. Darüber hinaus ist in Area X von Zebrafinken, einer für das Gesangslernen essentiellen Struktur, die Expression von FoxP2 während der Gesangslernphase höher als davor und danach. Das Expressionsniveau von FoxP2 korreliert also zeitlich mit der Lernphase. In Kanarienvögeln ist FoxP2 ebenfalls dann besonders stark experimentiert, wenn sich die Vögel in einer plastischen Phase ihres Gesangs befinden. Dies weist auf eine mögliche Funktion von FoxP2 bei der Gesangsplastizität hin. Durch die Verwendung eines lentiviralen Expressionssystems zur Induktion von RNAi im Zebrafinken wird gezeigt, daß die experimentelle Reduktion von FoxP2 das Gesangslernen tatsächlich beeinträchtigt. Das bedeutet, daß FoxP2 notwendig für auditorisch geleitetes, vokales Lernen ist. Diese Ergebnisse liefern das erste Beispiel einer funktionellen Genanalyse in einem Singvogel. Darüber hinaus deutet die Tatsache, daß FoxP2 sowohl notwendig für die Sprache des Menschen als auch den Gesang von Singvögeln ist darauf hin, daß die Ähnlichkeiten zwischen Gesangslernen und Spracherwerb bis auf die molekulare Ebene hinabreichen. Das molekulare Substrat für die Evolution der menschlichen Sprachfähigkeit ist demnach nicht ausschließlich bei den Hominiden zu finden.

Im Einklang damit steht, daß die Proteinsequenz von FoxP2 in allen Vertebraten extrem stark konserviert ist. Allerdings wurden beim Menschen Aminosäuresubstitutionen und ein Muster an Sequenzvariationen gefunden, welche darauf schließen lassen, daß FoxP2 in der jüngeren Vergangenheit der menschlichen Evolution unter Selektionsdruck gestanden hat. FoxP2 könnte demnach entscheidend zur Evolution von Sprache beigetragen haben. Zwar ist Sprache dem Menschen vorbehalten, aber einige wenige Arten, darunter Wale,

Fledermäuse und drei Ordnungen von Vögeln, sind in der Lage ihre Vokalisation durch Imitation zu erlernen. Im zweiten Teil meiner Dissertation, untersuche ich daher, ob ein Zusammenhang zwischen der Fähigkeit zur erlernten Vokalisation und dem Muster an Aminosäuresubstitutionen im FoxP2-Gen besteht. Hierzu werden die FoxP2-Sequenzen von 11 Vogelspezies, darunter Vertreter aus den drei Ordnungen von Gesangslernern und aus drei nicht-lernenden Vogelordnungen verglichen. Zur besseren phylogenetischen Einordnung wird zusätzlich die FoxP2-Sequenz des Krokodils, dem nächsten Verwandten der Vögel, analysiert. Es zeigen sich jedoch keine Hinweise darauf, daß die Fähigkeit zum Gesangslernen mit einer bestimmten FoxP2-Sequenz einhergeht. Demnach war FoxP2 entweder nicht direkt an der Evolution des Gesangslernens beteiligt, oder aber die Selektion hat auf die nicht-kodierenden Regionen von FoxP2 gewirkt, welche hier nicht untersucht wurden.

6.5 Publications

1. Kalscheuer VM, Freude K, Musante L, Jensen LR, Yntema HG, Gecz J, Sefiani A, Hoffmann K, Moser B, Haas S, Gurok U, **Haesler S**, Aranda B, Nshedjan A, Tzschach A, Hartmann N, Roloff TC, Shoichet S, Hagens O, Tao J, Van Bokhoven H, Turner G, Chelly J, Moraine C, Fryns JP, Nuber U, Hoeltzenbein M, Scharff C, Scherthan H, Lenzner S, Hamel BC, Schweiger S, Ropers HH; Mutations in the polyglutamine binding protein 1 gene cause X-linked mental retardation. *Nature Genetics*, 2003; **35**:313-5.
2. **Haesler S**, Wada K, Nshdejan A, Morrisey EE, Lints T, Jarvis ED, Scharff C; *FoxP2* expression in avian vocal learners and non-learners. *Journal of Neuroscience*, 2004; 24:3164-75.
3. Scharff C, **Haesler S**; An evolutionary perspective on FoxP2: strictly for the birds? *Current Opinion in Neurobiology*, 2005; 15: 694-703.
4. Wada K, Howard JT, McConnell P, Lints T, Rivas MV, Whitney O, Horita H, Patterson MA, White SA, Scharff C, **Haesler S**, Zhao S, Sakaguchi H, Hagiwara M, Shirakih T, Hirozane-Kishikawah T, Skenea P, Hayashizakih Y, Carninci P and Jarvis ED; A molecular neuroethological approach for identifying and characterizing a melody of behaviorally regulated genes. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 2006;103:5212-7.
5. **Haesler S**; Also sprach der Zebrafink. *Gehirn&Geist*, Heft 12, 2006
6. **Haesler S**, Licznarski P, Georgi B, Osten P, Scharff C; Knockdown of FoxP2 in songbird basal ganglia impairs song learning. *submitted*

Poster-presentations

- 1th Symposium of the “National Genome Research Network”, 2002, Berlin, Germany
- Berlin Neuroscience Forum, 2002, Liebenwalde, Germany
- Brain Research Symposium 2003, “Neurogenomics of mice and men”, New Orleans, USA
- 33th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2003, New Orleans, USA
- Berlin Neuroscience Forum, 2004, Liebenwalde, Germany
- 1st European Meeting of the Molecular and Cellular Cognition Society, 2004, Lissabon, Portugal
- 4th Forum of European Neuroscience, 2004, Lissabon, Portugal
- 34th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2004, San Diego, USA
- Hertie/FENS Winter School 2004 on “Research strategies for the study of animal models of cognition and its pathologies”, Kitzbühel, Austria,
- Gordon Research Conference on “Neural circuits and plasticity”, 2005, Newport, USA
- Berlin Neuroscience Forum, 2006, Liebenwalde, Germany
- 36th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2006, Atlanta, USA

Oral presentations

- 6th Schloessmann Symposium of the Max-Planck society on “Cognitive Neuroscience of Human Ontogeny”, 2005, Doellnsee, Germany
- 10th Conference of the International Association for the Study of Child Language (IASCL), 2005, Berlin, Germany
- “Day of Science 2005”; Seminar of the MPI for Molecular Genetics, Berlin, Germany
- “Birdsong in Behavioral and Neurobiological Research“, International Symposium at Freie Universität Berlin, 2006, Germany

Awards and Fellowships

- Fellow at the Hertie/Federation of European Neuroscience Societies (FENS) Winter School on “Research strategies for the study of animal models of cognition and its pathologies”, Kitzbühel, Austria,
- 1st prize for research proposal presented at the 6th Schloessmann Symposium of the Max-Planck society on “Cognitive Neuroscience of Human Ontogeny” and postdoc stipend, 2005, Doellnsee, Germany
- Poster prize at Berlin Neuroscience Forum, 2006, Liebenwalde, Germany

Patent

International patent (WO/2003/096964) *Means for use in treating diseases correlated with or caused by non-physiological levels of microtubule-associated PP2AC.*

Activities

- music (violin, piano)
- member of “Student Association” at MPI for Molecular Genetics
- Organisation of the seminar series “Branching Out - Professional possibilities after your PhD”
- “McKinsey educates”, 2005, initiative for the promotion of early scientific education of children by McKinsey&Company

6.6 Erklärung

Ich versichere hiermit, diese Arbeit selbstständig verfaßt und nur die angegebenen Hilfsmittel und Hilfen in Anspruch genommen zu haben. Alle Experimente und Analysen wurden von mir eigenständig durchgeführt, mit Ausnahme der *in situ* Hybridisierungen (mit Kazuhiro Wada, Duke University) und der Analyse der Phylogenetischen Verwandtschaft der FoxP2 Gene (mit Wolfgang Enard, MPI für Evolutionäre Anthropology).

Sebastian Haesler

Berlin, Dezember 2006

6.7 Acknowledgements

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Constance Scharff für die Betreuung dieser Arbeit, ihre geduldige Diskussionsbereitschaft und die vielen Möglichkeiten, die Sie mir eröffnet hat. Darüber hinaus möchte ich Prof. Hans-Joachim Pflüger für die weitere Betreuung und Begutachtung der Arbeit danken.

Ich möchte weiterhin danken

@ Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik: allen momentanen und früheren Mitglieder des Scharff-Labors für die nette Arbeitsatmosphäre und dafür, meine kleinen Macken geduldig ertragen zu haben. Im Besonderen möchte ich Arpenik Nshdejan für ihre Hilfe beim Klonieren und ihre freundliche Art danken, Sophie Scotto-Lomassese für ihre Hilfe mit den Zebrafinken, Lou Sternberg dafür, daß sie mir das Operieren gezeigt hat, Jeanette Birkenfeld für hervorragende Versorgung der Tiere, Susanne Finger für Hilfe mit Histologie und Gesangsanalyse und Prof. Hans-Hilger Ropers für seine Ermutigung und großzügige Unterstützung. Außerdem danke ich allen Kollegen vom "12:30-lunch-Diskussionsforum", in dessen Rahmen einige Male die Grenzen der Erkenntnis verrückt wurden.

@ Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie: Arturo Zychlinsky für den großzügig zur Verfügung gestellten Laborplatz, allen Mitgliedern des Zychlinsky-Labors, für den freundlichen Umgang, Bärbel Raupach für Unterstützung bei der Anmeldung der gentechnischen Arbeiten und Gisa Gerold für das Teilen von Freezer-Space und Zellkulturmaterial.

@ Max-Planck-Institute für Evolutionäre Anthropologie: Wolfgang Enard für die gute Zusammenarbeit im Rahmen der Analyse zur Evolution von FoxP2 in Vögeln.

@ Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung: Pawel Licznarski und Pavel Osten für die lentiviralen Konstrukte.

Prof. Gerhard Wenzel, Dr. Volker Mohler und Prof. Nicolaus von Wirén danke ich, mein Interesse an der wissenschaftlichen Arbeit geweckt und gefördert zu haben.

Zum Schluß möchte ich meinem Vater für die langjährige Unterstützung und sein großes Zutrauen danken. Meiner Mutter danke ich dafür, mir stets den Rücken gestärkt zu haben. Meinem Bruder Jakob danke ich für die moralische und kulinarische Unterstützung, Irina Schultz für ihren Rückhalt und dafür, mich oft mit dieser Doktorarbeit geteilt zu haben.

Berlin im Dezember 2006